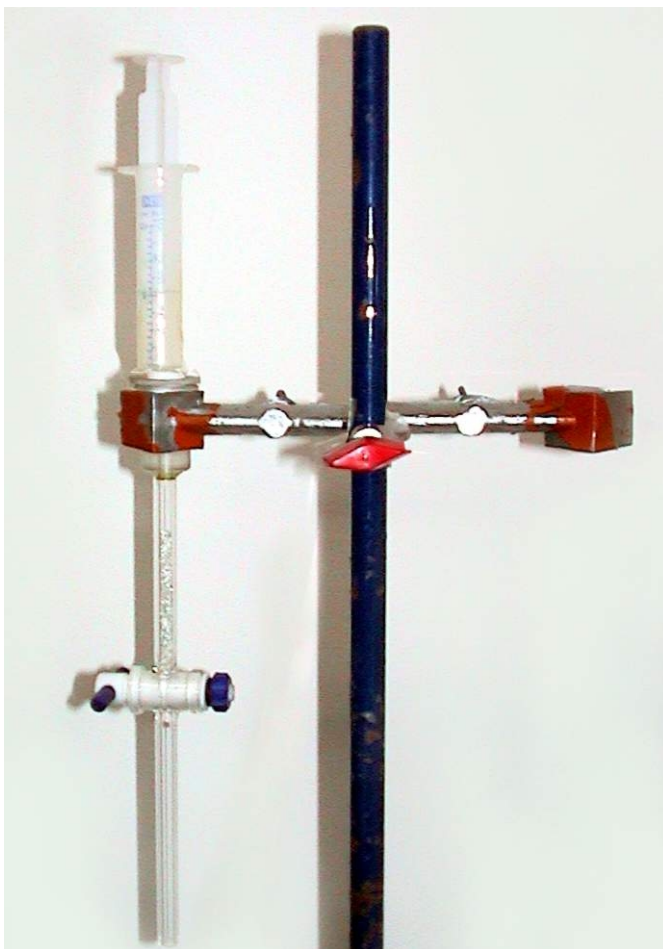


Projeto e Construção de um Biorreator de Leito Fixo, com Esferas Sinterizadas, para Uso no Cultivo de Célula Animal



República Federativa do Brasil

Luiz Inácio Lula da Silva

Presidente

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Roberto Rodrigues

Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa

Conselho de Administração

José Amauri Dimárzio

Presidente

Clayton Campanhola

Vice-Presidente

Dietrich Garhard Quast

Alexandre Kalil Pires

Sérgio Fausto

Urbano Campos Ribeiro

Membros

Diretoria Executiva da Embrapa

Clayton Campanhola

Diretor-Presidente

Gustavo Kauark Chianca

Hebert Cavalcante de Lima

Mariza Barbosa

Diretores-Executivos

Embrapa Instrumentação Agropecuária

Ladislau Martin Neto

Chefe-Geral

Álvaro Macedo da Silva

Chefe-Adjunto de Administração

Luiz Henrique Capparelli Mattoso

Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Elomir Antonio Perussi de Jesus

Gerente da Área de Comunicação e Negócios



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Instrumentação Agropecuária
Ministério da Agricultura e do Abastecimento*

ISSN 1678-0434

Novembro, 2003

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 06

Projeto e Contrução de um Biorreator de Leito Fixo, com Esferas Sinterizadas, para Uso no Cultivo de Célula Animal

Breno Bozola Grou
Odilio Benedito Garrido Assis

São Carlos, SP
2003

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Instrumentação Agropecuária
Rua XV de Novembro, 1452
Caixa Postal 741
CEP 13560-970 - São Carlos-SP
Fone: (16) 274 2477
Fax: (16) 272 5958
www.cnpdia.embrapa.br
E-mail: sac@cnpdia.embrap.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Dr. Luiz Henrique Capparelli Mattoso
Secretária-Executiva: Janis Aparecida Baldovinotti
Membros: Dr. Odílio Benedito Garrido de Assis,
Dr. João de Mendonça Naime,
Dr. Rubens Bernardes Filho,
Dr. Washington Luiz de Barros Melo
Membro Suplente: Dra. Débora Marcondes Bastos Pereira Milori

Supervisor editorial: Dr. Odílio Benedito Garrido de Assis
Revisor de texto: Janis Aparecida Baldovinotti
Normalização bibliográfica: Janis Aparecida Baldovinotti
Tratamento de ilustrações: Valentim Monzane
Foto(s) capa: Rubens Bernardes Filho
Editoração eletrônica: Valentim Monzane

1ª edição

1ª impressão (2003): tiragem 300

Todos os direitos reservados.

**A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).**

**CIP-Brasil. Catalogação-na-publicação.
Embrapa Instrumentação Agropecuária**

GROU, Breno Bozola

Projeto e construção de um biorreator de leito fixo, com esferas sinterizadas, para uso no cultivo de célula animal. / Breno Bozola Grou, Odílio Benedito Garrido Assis. São Carlos: [Embrapa Instrumentação Agropecuária], 2003.

23 p. : il. (Embrapa Instrumentação Agropecuária. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, ISSN 1678-0434; n. 06).

1. Biorreator. 2. Sinterização viscosa. 3. Meio poroso. 4. Imobilização de células. 5. Leito fixo. I. Assis, Odílio Benedito Garrido de. II. Embrapa Instrumentação Agropecuária. III. Título. IV. Série.

CDD (21. Ed.) 660.2842

© Embrapa 2003

Sumário

Resumo5

Abstract6

Introdução7

Material e Métodos8

Resultados e Discussão13

Conclusões21

Referências Bibliográficas21

Projeto e Construção de um Biorreator de Leito Fixo, com Esferas Sinterizadas, para Uso no Cultivo de Célula Animal

Breno Bozola Grou¹

Odilio Benedito Garrido Assis²

Resumo

Neste apresentado é apresentado as etapas de processamento de um de leito fixo, constituído de esferas de vidro sinterizadas, para uso como reator de ancoramento de célula animal. A confecção do meio poroso segue os princípios cerâmicos de sinterização viscosa sob temperatura controlada, em molde de aço para estabelecimento de densidade e formato definidos. O reator de forma cilíndrica foi projetado para adequar a adesão e cultivo de células de linhagem CHO-K1 (*Chinese Hamster Ovary*). Essas células tem alto interesse do ponto de vista biotecnológico, com subprodutos de larga aplicação na área farmacêutica e veterinária. A linhagem CHO-K1 apresenta particularidades de cultura, requerendo a montagem de reator com características específicas, que foram observadas neste trabalho. Caracterização teórica do meio poroso sinterizado e avaliações da estrutura por tomografia de RMN foram realizadas.

¹Estagiário Técnico, Graduação em Engenharia Química pela UFSCar, São Carlos, SP

²Físico. MSc em Engenharia Metalúrgica, PhD em Ciência dos Materiais, pesquisador Embrapa Instrumentação Agropecuária, São Carlos, SP

Project And Assembly Of A Fixed Bed Bioreactor, With Sintered Spheres, For Use In Animal Cell Culture

Breno Bozola Grou
Odilio Benedito Garrido Assis

Abstract

In this work, the processing steps of a fixed bed constituted of sintered glass beads for use as anchoring animal cell reactor, are presented. The porous medium follows the ceramic principles of viscous sintering under controlled temperature, making use of a still based mold to guarantee defined density and shape. The reactor setting in cylindrical shape, was projected to be suitable to the adhesion and growing of cell from CHO-K1 (Chinese Hamster Ovary) origin. Such cells have of great biotechnological appeal, with subproduct with broad pharmaceutical and veterinary applications. The CHO-K1 cell presents particularities demanding a reactor set-up with specific features, observed along this work. A theoretical characterization of sintered porous medium and structural evaluation by RMN tomograph were carried out.

Introdução

O cultivo de célula animal desempenha um papel muito importante na biotecnologia moderna, especialmente no que se refere à produção de enzimas, hormônios, anticorpos e proteínas. Esses produtos são amplamente utilizados nas áreas de biomédica, alimentos, agropecuária e farmacológica, e também na indústria de vacinas e em bio-indústrias.

O cultivo em grande escala de células animais é indispensável na produção de produtos terapêuticos e proteínas. A tecnologia praticada no cultivo de células animais é relativamente nova, pois tem sido desenvolvida nos últimos 15 anos. O número de produtos terapêuticos comercializados cresceu muito nos últimos anos e representa um valor negociado de mais de 10 bilhões de dólares. É esperado que este valor dobre ou triplique nos próximos 4 ou 5 anos como resultado de um aumento do uso de proteínas terapêuticas nos tratamentos médicos (Centro Franco-Brasileiro..., 2002).

A necessidade da produção de um grande número de produtos terapêuticos em grandes quantidades demanda o aumento de produtividade dos biorreatores que trabalham com células animais. Um dos principais objetivos no desenvolvimento de processos comerciais é a diminuição dos custos através do aumento da produtividade. Para alcançar esse objetivo, sistemas com alta densidade celular e com bom potencial de scale-up são requeridos. Para que seja possível esse desenvolvimento, a contribuição de áreas de conhecimento como o metabolismo e fisiologia celular, secreção de proteínas e de engenharia dos bioprocessos são de grande importância.

A produção de muitas proteínas recombinantes só é possível com células animais, uma vez que células microbianas que aparentemente estavam melhores adaptadas aos processos industriais não possuem a capacidade de produzir proteínas de mamíferos com completa fidelidade. Já as células que as produzem, as fazem passar por uma série de modificações pós-traducionais, antes de a proteína ser secretada, em geral extracelularmente, favorecendo a preservação da atividade biológica desejada. (Mather e Barnes, 1998). A linhagem de célula animal de interesse nesse contexto é a CHO-K1 (Chinesa Hamster Ovary). A célula CHO-K1 necessita de ancoramento para crescer e manter suas funções vitais. O ancoramento é normalmente feito pela célula em monocamadas, sobre a superfície de partículas chamadas de microcarregadores produzidas especialmente para fornecer o ancoramento e crescimento da célula animal. Para atingir esse objetivo os microcarregadores são projetados para preencher vários requisitos com relação a densidade, carga elétrica, toxicidade, tamanho de partículas, porosidade e área superficial específica.

Estudos realizados por vários pesquisadores utilizando microcarregadores de vidro em reatores de leito fixo têm mostrado resultados bastante interessantes para o cultivo de célula animal dependente de ancoramento. Como

características de maior destaque atribuídas a esse tipo de microcarregador podem-se citar: material inerte, boa compatibilidade superficial com a célula animal, custo baixo e possibilidades de reutilização quase ilimitadas. Como inconveniente mais importante tem-se acentuada morte celular devido as colisões e atritos entre as partículas normalmente encontrados em leitos fixos.

A engenharia bioquímica brasileira pode desempenhar um papel muito importante ao utilizar, como no caso do vidro e materiais similares, matérias-primas nacionais e criar novas alternativas tecnológicas que venham a substituir os microcarregadores importados. Como principais benefícios desta substituição cabe esperar a diminuição da dependência tecnológica externa e viabilização de bioprocessos com célula animal mais econômicos.

O objetivo deste boletim é apresentar uma metodologia de produção de um meio poroso vítreo sinterizado consolidado, desenvolvido na Embrapa Instrumentação Agropecuária, apropriado à montagem de reator de leito fixo compatível com o ancoramento e cultivo da célula animal CHO-K1.

Material e Métodos

Para atender os objetivos estabelecidos utilizaram-se esferas de vidro de fabricação nacional para serem processadas variando as condições do tratamento térmico para poder identificar qual seria a mais conveniente para gerar um produto sinterizado com mínima perda de área superficial.

Os materiais, equipamentos e métodos utilizados para conduzir esses trabalhos foram esferas de vidro comerciais de 1mm de diâmetro. A composição química das esferas de vidro pode ser visualizada na Tabela 1 (Potters, 2000).

Tabela 1: Composição química média das esferas de vidro.

Óxido	% Mássica
Si O ₂	72,5
Na ₂ O	13,7
CaO	9,8
MgO	3,3
Al ₂ O ₃	0,4
Fe ₂ O ₃	0,2
FeO	0,2
K ₂ O	0,1
Outros óxidos	< 0,3

- Equipamentos utilizados:

- Forno da marca EDG Equipamentos com sistema de programação de temperatura, tempo e taxa de velocidade de aquecimento. Dimensões: 15cm 15cm 35cm. Aquecimento na temperatura de 1700 oC.

- Tomógrafo computadorizado de ressonância magnética nuclear da marca Varian Inova de 400 MHz .
- - Balança da marca Marte Balanças e Equipamentos, modelo AS2000C.
- - Caulim, ponto de fusão (1800°C).
- - Produtos químicos utilizados para limpeza do vidro: água destilada, NH_4OH , H_2O_2 e H_2SO_4 .

Construção do Molde de Aço Resistente a Altas Temperaturas

O molde de aço utilizado na confecção dos meios porosos de vidro foi construído de tal forma que as dimensões da peça sinterizada pudesse atender as medidas do biorreator. O molde possui formato cilíndrico com diâmetro interno de 2,2 cm, sendo de montagem bi-partida , esquematizado na Figura 1.

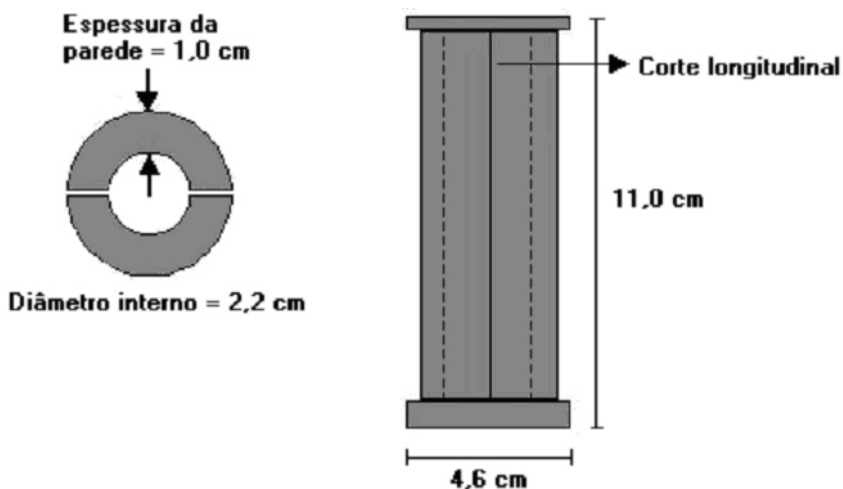


Figura 1: Diagrama do molde em aço AISI 1010, resistente a altas temperaturas

O molde é necessário para o acondicionamento das partículas e esferas em seu interior, gerando no aquecimento o formato cilíndrico interno da peça. A seqüência experimental com detalhes em cada estágio é apresentada na Figura 2.

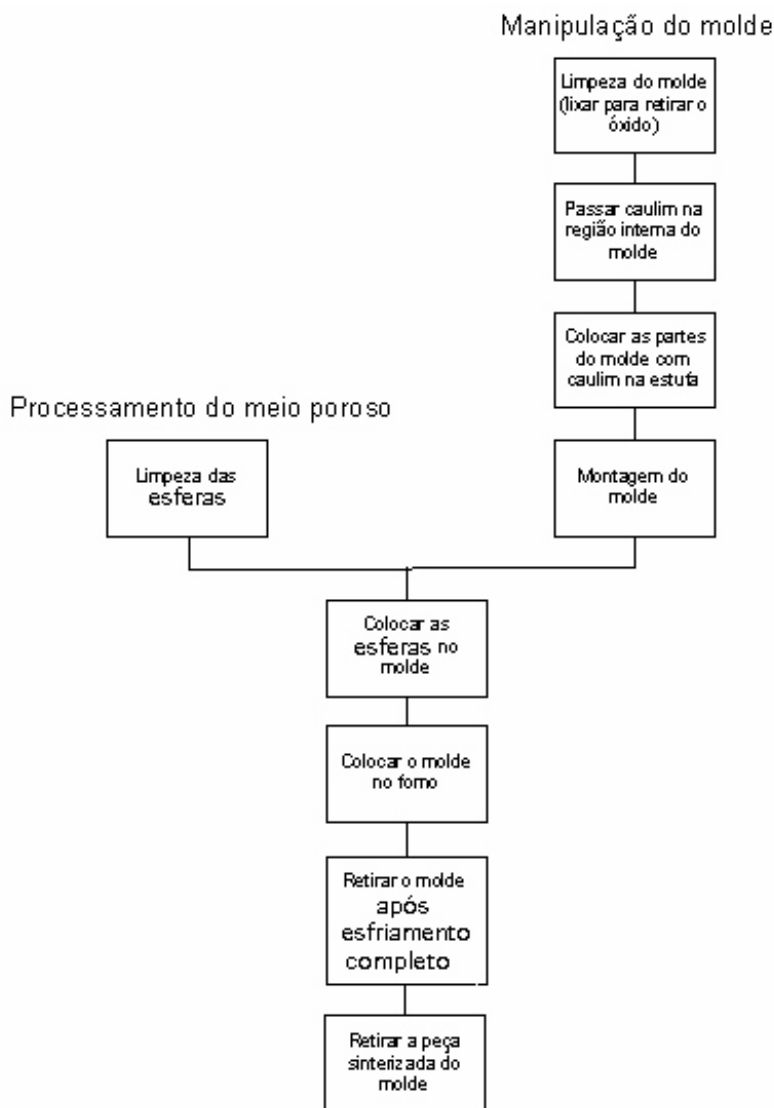


Figura 2: Sequência experimental para a confecção do meio poroso.

Caracterização do Meio Vitreo Poroso

O meio vítreo sinterizado foi caracterizado com respeito a porosidade aparente, tomando as relações de massas após a saturação em água. As equações verificadas foram:

$$PA(\%) = \frac{Pu}{Pu} \frac{Ps}{Pi} 100\% \quad (1)$$

$$AA(\%) = \frac{Pu}{Ps} \frac{Ps}{Ps} 100\% \quad (2)$$

$$DA = \frac{PA}{AA} 0,99 \frac{Ps}{Pu} \frac{Ps}{Pi} \quad (3)$$

Sendo, $PA(\%)$ = Porosidade aparente;

$AA(\%)$ = Absorção de água;

DA = Densidade aparente;

Pu = Peso úmido;

Ps = Peso seco;

Pi = Peso imerso.

A área superficial das peças foi determinada através da relação entre a massa de água aprisionada na peça sinterizada, calculando-se o seu volume por meio da densidade da água, ou seja:

$$m_{\text{água}} = \frac{Pu - Ps}{\rho_{H_2O}} \quad (4)$$

$$V_{H_2O} = \frac{m_{H_2O}}{\rho_{H_2O}} \quad (5)$$

$$V_{\text{cilindro}} = \frac{\pi d_l^2}{4} h \quad (6)$$

Onde, $m_{\text{água}}$ = Massa de água na peça sinterizada;

Pu = Peso úmido;

Ps = Peso seco;

ρ_{H_2O} = Densidade da água ($\rho_{H_2O} = 1 \text{ g/cm}^3$, 25°C)

V_{H_2O} = Volume de água na peça sinterizada;

V_{cilindro} = Volume do cilindro ou volume da peça sinterizada.

Conhecendo-se o volume de água que se encontrava na peça sinterizada e o volume do cilindro torna-se possível estimar a porosidade da mesma utilizando-se a equação (7).

$$\% \text{ Porosidade} = 100 \frac{V_{H_2O}}{V_{\text{cilindro}}} \quad (7)$$

Sendo, $\%$ = Porosidade

V_{H_2O} = Volume de água na peça sinterizada;

V_{cilindro} = Volume do cilindro ou volume da peça sinterizada.

Por meio da porosidade da peça sinterizada calculou-se a superfície específica, razão entre a área total da superfície de contato entre as partículas e o fluido e o volume do leito, e finalmente a área superficial.

$$CH = \frac{6 (1 - \epsilon)}{d_p} \quad (8)$$

$$\frac{d_p}{d_l} = 1, \text{ para esferas} \quad (9)$$

$$CH = \frac{A_{Sup}}{V_{Cilindro}} \quad A_{Sup} = CH \cdot V_{Cilindro} \quad (10)$$

Onde, CH = Superfície específica;
 ϵ = Porosidade;
 M = Módulo de Thiele;
 d_p = Diâmetro da esfera de vidro;
 d_l = Diâmetro do cilindro;
 A_{Sup} = Área superficial.

A área superficial teórica, foi então estabelecida considerando-se um cilindro sólido com as mesmas dimensões (altura e diâmetro) das peças de vidro sinterizado de interesse, sendo o volume:

$$V_{cil} = \frac{\pi d_l^2}{4} h \quad (11)$$

Onde, V_{cil} = Volume do cilindro;
 d_l = Diâmetro do cilindro;
 h = altura do cilindro.

Conhecendo o diâmetro médio das esferas de vidro (12) torna-se possível estabelecer o número de esferas que ocupariam o cilindro, equação (13).

$$V_{esfera} = \frac{4}{3} \pi r^3 \quad (12)$$

$$\text{número de esferas} = \frac{V_{cil}}{V_{esfera}} \quad (13)$$

Sendo que a área superficial de cada esfera é dada pela equação (14), a área superficial calculada pela ocupação de todas as esferas contida no cilindro, é:

$$A_{sup.esf} = 4 \pi r^2 \quad (14)$$

$$A_{sup.Total} = n \cdot A_{sup.esf} \quad (15)$$

Conhecendo-se a área superficial teórica e a área superficial da peça de vidro sinterizado calculou-se a área perdida com a sinterização, ou seja, a área correspondente as esferas de vidro que foram sinterizadas para formar a peça.

$$A_{\text{sint}} = A_{\text{sup.Total}} - A_{\text{sup}} \quad (16)$$

Onde, A_{sint} = Área perdida com a sinterização;

A_{sup} = Área superficial da peça de vidro sinterizado;

$A_{\text{sup.Total}}$ = Área superficial de todas as esferas contidas no cilindro.

Tomografia de Ressonância Magnética Nuclear

A tomografia por ressonância magnética consiste de um método não invasivo capaz de fornecer informações sobre os estados químicos e físicos de materiais sem alteração da amostra. A tomografia foi aqui empregada para a visualização da distribuição das esferas no interior da peça sinterizada. Esse tipo de caracterização é importante pois permite verificar se o processo de sinterização ocorreu de maneira uniforme e se houve a formação de caminhos preferenciais no interior do leito.

Para a geração de imagens, o interior do meio poroso sinterizado foi saturada com água, o que foi conseguido pelo encapsulamento prévio da peça em suas laterais com termoplástico.

Funcionalização do Meio de Vidro Sinterizado

O tratamento químico realizado nas peças de vidro sinterizado trata-se fundamentalmente em uma limpeza que eleva a exposição dos sítios silanóis superficiais disponíveis, favorecendo assim a adesão de agentes orgânicos através de ligações por grupos hidroxilas. Neste tratamento seguiu-se a seqüência proposta por Kern (1993), conhecida como técnica “piranha”, que consiste na imersão dos materiais em uma solução de H₂SO₄/H₂O₂ (7:3 v/v). O sistema foi aquecido até início de ebulição e então depois de resfriado conduzindo a limpeza no ultra-som por 40 minutos. Após este período o material foi exaustivamente lavado com água ultrapura, seguido de imersão em solução de H₂O/NH₄OH/H₂O₂ (5:1:1 v/v/v), levados ao ultra-som por 40 minutos e novamente limpos com água ultrapura.

Resutados e Discussão

Com respeito a sinterização homogênea do meio poroso, algumas observações podem ser destacadas: i) a posição do molde dentro do forno, deve ser observada com cuidado, considerando a existência de uma distribuição de calor não homogênea no forno. O posicionamento vertical do molde parece ser mais

favorável a uma melhor sinterização que a posição horizontal; ii) a utilização do caulim como desmoldante. O caulim é um pó de coloração marrom claro que possui um elevado ponto de fusão. O caulim misturado a água forma uma solução viscosa, que aplicado sobre a superfície interna do molde de aço de maneira que formasse um filme. Após um período de aproximadamente dez minutos, quando o filme se apresentava seco, o molde era usado normalmente; iii) manutenção de uma temperatura com pouca flutuação durante a sinterização mostrou-se fundamental para consecução de uma peça homogênea. Os melhores resultados foram para uma temperatura de $755 (\pm 3) ^\circ\text{C}$ durante um período de 40 minutos.

A Figura 3 apresenta a foto de duas peças de vidro sinterizado nas condições descritas.



Figura 3: Peças de vidro sinterizado, para uso como leito em biorreatores.

O cálculo das características físicas, fazendo uso das equações (1), (2) e (3) resultaram nos valores da Tabela 2.

Tabela 2: Massa seca, massa úmida, porosidade aparente, absorção de água e densidade aparente.

Peça	Peso seco (g)	Peso úmido (g)	Peso imerso (g)	PA (%)*	AA (%)**
27	55,15	63,59	22,32	20,45	15,30
28	56,63	63,57	22,40	16,86	12,25
29	55,51	64,09	22,46	20,61	15,46
30	55,78	64,13	22,54	20,08	14,97
31	56,06	63,96	22,55	19,08	14,09
32	54,67	64,00	22,06	22,25	17,07

*PA = Porosidade aparente e **AA = absorção de água.

A área superficial das peças de vidro sinterizado foi obtida pelo uso das equações (4) a (10). Lembrando que as peças foram numeradas de acordo com o ensaio de sinterização realizado, temos a seguir a Tabela 3 que apresenta os valores da massa de água contida na peça, porosidade, superfície específica e área superficial das peças de interesse.

Tabela 3: Valores da massa de água contida na peça, porosidade, superfície específica e área superficial das peças de interesse.

Peça	m H ₂ O (g)	Porosidade	Sup. Esp (cm ² /cm ³)	Área (cm ²)	Área (m ²)
27	8,44	0,24	45,52	1591,80	0,159
28	6,94	0,20	48,09	1681,80	0,168
29	8,58	0,25	45,28	1583,40	0,158
30	8,35	0,24	45,67	1597,20	0,160
31	7,90	0,23	46,45	1624,20	0,162
32	9,33	0,27	43,99	1538,40	0,154

A Tabela 4 por sua vez apresenta os valores que foram utilizados para realizar o cálculo da área superficial teórica assim como a área perdida com a sinterização, ou seja, a área correspondente as esferas de vidro que foram sinterizadas para formar a peça. As equações que foram utilizadas nos cálculos foram as equações (11) a (16).

Tabela 4: Valores que foram utilizados para o cálculo da área superficial teórica, área superficial da peça de vidro sinterizada e área perdida com a sinterização.

Peça	V _{cil} (cm ³)	V _{esf} (cm ³)	Número de esferas	Área _{sup.esf} (cm ²)	Área _{sup.Total} (cm ²)	Área _{sup.pe} (cm ²)	Área _{sint} (cm ²)
27	34,21	0,000523	65340	0,03142	2052,72	1591,80	460,92
28	35,35	0,000523	67518	0,03142	2121,15	1681,80	439,35
29	34,60	0,000523	66066	0,03142	2075,53	1583,40	492,13
30	35,73	0,000523	68244	0,03142	2143,95	1597,20	546,75
31	34,60	0,000523	66066	0,03142	2075,53	1624,20	451,33
32	34,97	0,000523	66792	0,03142	2098,34	1538,40	559,94

Podemos verificar na Tabela 4 que a variação dos volumes dos cilindros se deve somente a diferença de altura entre as peças, uma vez que o diâmetro era o mesmo. Podemos perceber que a área perdida com a sinterização representa, em média, 23% da área de sinterização total. Esse valor foi minimizado o máximo possível uma vez que o objetivo era obter uma peça de vidro sinterizado rígida e com uma maior área superficial possível.

As análises por tomografia de RMN corroboram com os resultados teróricos, as imagens na Figura 4 apresenta cortes transversais da peça sinterizada. Cabe salientar que as áreas brancas representam a água no interior da peça.

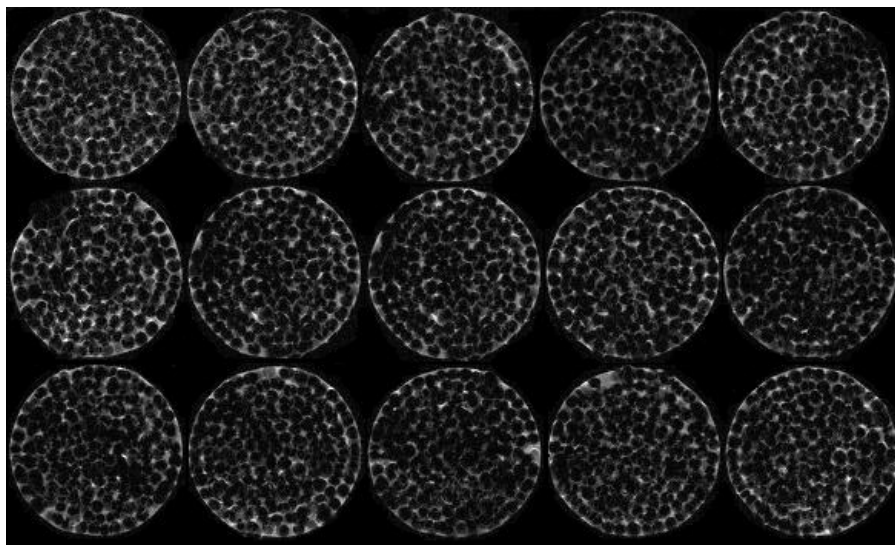


Figura 4: Imagens de cortes transversais da peça sinterizada por RMN.

Os cortes transversais foram realizados em diferentes alturas da peça para verificar a distribuição das esferas de vidro no seu interior. Nota-se que a distribuição das esferas de vidro está uniforme o que mostra que o processo de sinterização foi realizado com sucesso, com ausência significativa de canais preferenciais ou cavitações pronunciadas.

Para o dimensionamento do biorreator de leito fixo levou-se em conta que o volume máximo ocupado pelo leito de microcarregador deve corresponder a 75% do volume total do biorreator. O diâmetro interno do biorreator é de 22 mm, o que corresponde a uma área da secção transversal do tubo de 0,152 cm². Na figura 5 é possível observar o esquema do biorreator de leito-fixo construído. Este biorreator apresenta diâmetro interno de 2,2cm, 31cm de altura e um volume de 0,47 litros.

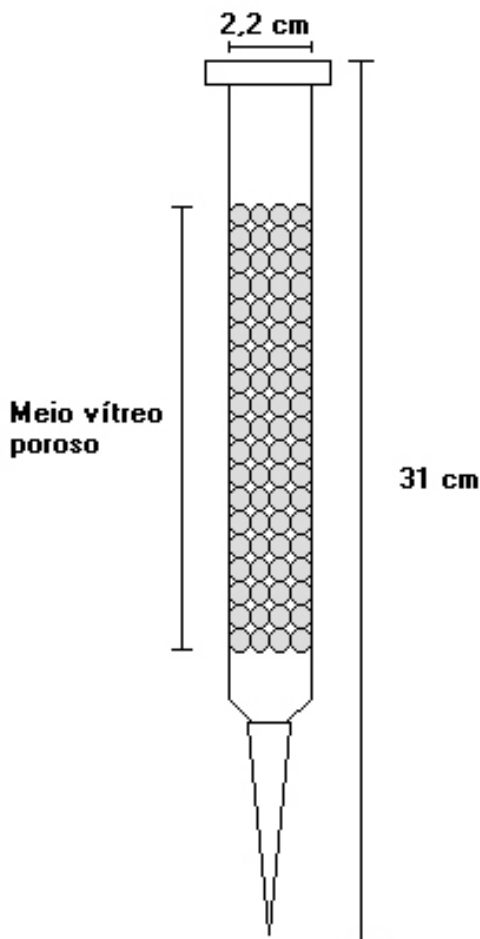


Figura 5: Esquema do biorreator de leito-fixo com leito de esferas de vidro sinterizadas.

O biorreator apresentado na Figura 5 é constituído pelas seguintes partes:

- Corpo principal de vidro (tubo);
- Ponta afunilada de vidro;
- Duas peças de esferas de vidro sinterizado fixas no interior do corpo principal.

As partes que constituíam o biorreator foram fixadas utilizando cola de silicone. Para uma melhor visualização do biorreator de leito fixo, as Figuras 6 e 7 representam o aspecto final do biorreator.

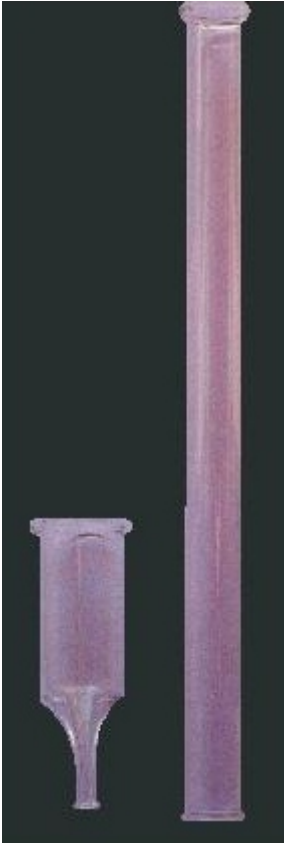


Figura 6: Foto das partes que compõe o biorreator.



Figura 7: foto do biorreator montado.

Considerações acerca do cultivo das Células CHO-K1 (Chinese Hamster Ovary)

Embora neste trabalho não seja descrito a eficiência obtida pela imobilização das células CHO-K1 no reator confeccionado, torna-se importante detalhar as características deste biomaterial: a mais notável das características da célula CHO-K1, o que torna sua cultura em larga escala diferente das convencionais, é sua fragilidade. Estas células são facilmente afetadas por movimentos mecânicos e não podem ser submetidas às mesmas condições de aeração e agitação usadas nas fermentações microbianas. A fragilidade das células CHO-K1 deve-se à falta de uma parede celular rígida, para protegê-las das variações que podem ocorrer no ambiente. A fragilidade desta célula não representa nenhuma barreira para o uso de agitação e aeração desde que o biorreator trabalhe com condições moderadas.

Felizmente essas células possuem um crescimento satisfatório em sistemas de batelada apesar de não atingirem a alta densidade celular (biomassa) vista nos sistemas microbianos. Também não necessitam de altas quantidades de oxigênio que são características dos sistemas microbianos.

As células CHO podem ser classificadas como uma linhagem de células estabelecidas ou células transformadas, podem ser cultivadas indefinidamente e muitas são de origem tumoral. Linhagens de células pertencentes a esta categoria crescem mais facilmente e são mais estáveis que células primárias, células que foram dissociadas do tecido e inoculadas diretamente para o cultivo.

Apesar da linhagem de células CHO apresentarem uma série de empecilhos para seu cultivo, ela é considerada a mais utilizada e esta tornando-se a escolha preferida para a expressão de glicoproteínas recombinantes.

As células animais de linhagem CHO-K1 podem sintetizar glicoproteínas humanas recombinantes, devido à presença de enzimas de glicosilação. Assim, existe semelhança entre essas glicoproteínas sintetizadas pela célula animal e aquelas encontradas nas células humanas. As células CHO podem ser classificadas como uma linhagem de células estabelecidas ou células transformadas. Linhagens de células desta categoria crescem mais facilmente e são mais estáveis do que células primárias, células que foram dissociadas do tecido e inoculadas diretamente para o cultivo, e do que células diplóides, células que não formam tumores e que possuem uma vida finita na cultura.

Os principais produtos obtidos pelo cultivo de células CHO são apresentados na Tabela 5 (Phillips e Poon, 1988), além de diversos subprodutos de uso farmacêutico e veterinário.

Tabela 5: Principais produtos obtidos através do cultivo de células CHO (Chinese Hamster Ovary).

Proteína Recombinante
Fator estimulante da colônia Granulócito (G-CSH)
Hormônio estimulante do folículo humano (huFSH)
Interleucina-2 humana (huIL-2)
Ativador de plasminogênio tissular (tPA)
Eritropoietina humana (huEPO)
Interleucina-6 humana (huIF-6)
-interferon humana (huIFN-)
Calicreína tecidual humana (huTK)
Antitrombina III humana (huATP)

A Tabela 6 apresenta alguns produtos farmacêuticos licenciados que são produzidos por células CHO.

Tabela 6: Produtos farmacêuticos licenciados produzidos por células CHO.

Produto	Uso Clínico	Sistema de Produção
Beta-interferon	Câncer, infecção viral	Vários
Eritropoietina	Anemia	Garrafas rotatórias
Ativador do tecido plasminogênico	Trombose	Tanque agitado
Fator VIII	Hemofilia	Vários
Antígeno hepatite B	Vacina	

A escolha do biorreator para cultivo celular depende de uma série de fatores, dentre os quais podemos citar:

- Tipo de célula;
- Natureza do produto;
- Escala dos equipamentos;
- Disponibilidade de espaço e serviços;
- Capital e custos operacionais dos equipamentos.

Células animais podem ser dependentes de ancoramento, necessitando assim um suporte físico para crescerem, como por exemplo, o meio poroso sinterizado. Células animais crescem em velocidade muito baixa, e muitas vezes secretam produtos mesmo estando em fase de crescimento. Por esse motivo, os processos que incluem algum tipo de separação de células permitem manter o maior número possível de células produtoras dentro do reator, conseguindo-se assim aumento de produtividade.

Os biorreatores de leito fixo podem apresentar certa desvantagem em relação aos outros tipos de biorreatores quando analisamos a possível formação de canais preferenciais devido à distribuição irregular das partículas no leito. Também pode-se considerar uma desvantagem o possível esmagamento das células devido ao contato e/ou colisão entre as partículas que compõe o leito.

O biorreator de leito fixo proposto neste trabalho é de certa forma inovador pois o leito é formado por esferas de vidro sinterizado que formam uma peça única e a caracterização realizada mostrou a ausência de canais preferenciais significantes. Assim o leito fixo desse biorreator apresenta algumas diferenças em relação aos biorreatores de leito fixo convencionais. Como diferença podemos citar a vantagem de não haver o esmagamento das células devido a colisão entre as partículas uma vez que elas estão sinterizadas e portanto fixas umas as outras. Entretanto, o principal problema que o biorreator de leito fixo formado por esferas de vidro sinterizado pode apresentar é justamente a formação de canais preferenciais.

A Figura 8 apresenta a proposta de emprego do biorreator desenvolvido a ser testado em continuidade a este trabalho.

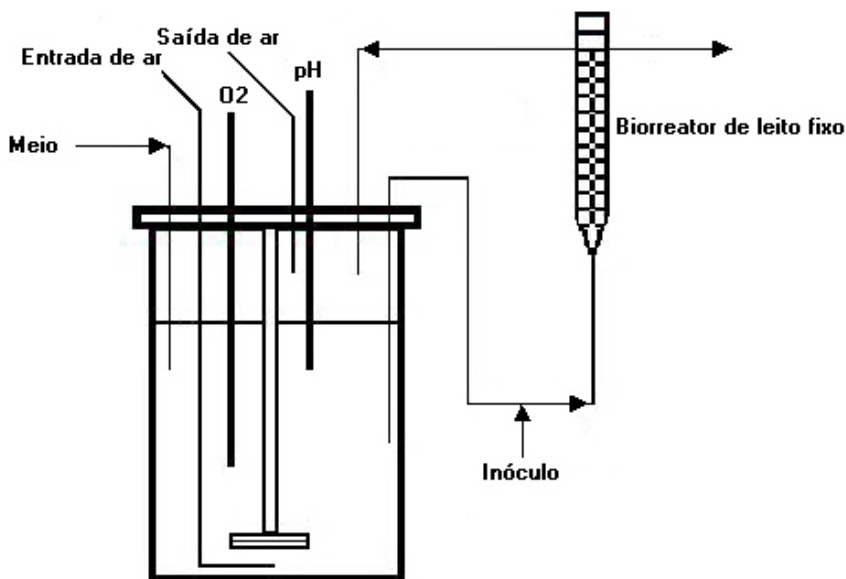


Figura 8: Diagrama esquemático do sistema para a cultura de célula animal dependente de ancoramento fazendo uso do leito-fixo desenvolvido neste trabalho.

Conclusões

Tendo em vista que o objetivo deste trabalho, de estabelecer uma metodologia de produção de meios porosos vítreos adequado para serem utilizados como matriz de ancoramento em biorreatores de leito fixo para cultivo da célula animal CHO-K1, podemos concluir que obtivemos peças com resultados. As peças sinterizadas foram reprodutivas com resistência mecânica significativa e distribuição interna das esferas uniformes e sem caminhos preferenciais significativos. Além disso o biorreator de leito fixo foi construído com sucesso adequando as exigências de ancoramento de células como as CHO-K1, de interesse farmacêutico-veterinário, que é o objetivo principal deste estudo.

Referências Bibliográficas

CENTRO FRANCO-BRASILEIRO DE DOCUMENTAÇÃO TÉCNICA E CIENTÍFICA (São Paulo, SP). Science & Technologie au Brésil. (B E CENDOTEC, n. 24. Jun 2002. Disponível em: <<http://www.cendotec.org.br/be/be24.pdf>>

KERN, W. (Ed.). Handbook of Semiconductor Wafer Cleaning Technology. New Jersey: Noyes Publications, 1993. p. 19.

MATHER, J.; BARNES, D. Animal Cell Culture Methods. 1st ed. San Diego: Academic Press, 1998. 399p.

PHILLIPS, C. R.; POON, Y. C. Immobilization of Cells. Berlin, New York: Springer-Verlag, 1988. 167 p. (Biotechnology Monographs, vol. 5).

POTTERS Industrial Ltda. Catálogo Técnico. Rio de Janeiro, Br, 2000.